당뇨병 동물모델에서 PPAR-γ, -α Agonists 및 Metformin의 당뇨병성 심근병증에 대한 치료효과

연세대학교 대학원
의 학 과
이 광 은

당뇨병 동물모델에서 PPAR-γ, -α Agonists 및 Metformin의 당뇨병성 심근병증에 대한 치료효과

지도교수 차 봉 수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 광 은

이광은의 석사 학위논문을 인준함

심 사 위 원 _____ 인

심 사 위 원 _____ 인

심 사 위 원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 끊임없이 지도해 주시고 자상함으로 이끌어 주신 차봉수 교수님께 진심으로 감사드리며, 본 연구를 위하여 각별한 조언을 아끼지 않으신 이현철 교수님, 이문형 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 연구와 분석에 도움을 주신 강석민 교수님, 김수경 선생님, 조정산 선생님, 이용직 선생님 그리고 항상 힘이 되어 주는 내과 의국원 여러분들에게 감사드립니다.

이 자리에 오기까지 사랑과 격려로 키워주신 부모님과 사랑하는 아내에게 이 논문을 드립니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

표 차례

국문요약

당뇨병 동물모델에서 PPAR-γ,-α Agonists 및 Metformin의 당뇨병성 심근병증에 대한 치료효과

당뇨병성 심근병증은 관동맥질환과 무관하게 심실 기능의 장애가 초래되는 질환으로 아직까지 정확한 기전에 대해서는 논란이 많은 실정이다. 본 연구에서는 제2형 당뇨병 동물모델을 이용하여 당뇨병성 심근병증의 발생여부와 치료에 의해 회복되는지 여부를 알아보고자 하였다.

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF) rat은 사람의 제2형 당뇨병과 유사한 동물모델로서 비만하며, 인슐린 저항성을 가지고, 고지혈증과 고혈당을 보이는 특징을 가지며, 20주경에 당뇨병이 발현하는 것으로 알려져 있다. 경구 당부하검사를 통해 당뇨병이 확인된 쥐를 8주간 사육후 vehicle 투여군(O-C), pioglitazone 투여군(O-P, 10 mg/kg/day), fenofibrate 투여군(O-F, 150 mg/kg/day), metformin 투여군(O-M, 300 mg/kg/day)으로 나누어 28주부터 10주간 치료하였다.

대조군으로 Long-Evans Tokushima Otsuka(LETO, n=10) rats을 사용하였으며, 치료 전후 모든 쥐에서 도플러 심초음파 검사를 시행하였다.

38주에 O-C는 LETO군에 비해 E wave deceleration time(DTe)의 증가(74.3±3.7 vs. LETO, 56.3±3.8 ms, $p<0.001$)와 E/A ratio의 감소(1.25±0.06 vs. LETO, 1.54±0.08, $p<0.01$)를 보였다. Pioglitazone,

fenofibrate 및 metformin으로 치료한 OLETF rat군에서는 O-C에 비하여 DTe(O-P, 51.6±1.7; O-F, 61.1±4.3; O-M, 57.3±4.7 ms, $p<0.001$, respectively)와 E/A ratio(O-P, 1.39±0.06, $p<0.05$; O-F, 1.57±0.05, $p<0.05$; O-M, 1.26±0.03, NS)의 향상을 관찰할 수 있었다. 이에 비해 심실의 수축기능과 관련된 변수들은 모든 군간에 차이가 없었다.

결론적으로 PPAR-γ, -α agonists 및 metformin은 OLETF rats에서 발생한 당뇨병성 심근병증을 예방할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 이들 약제들이 당뇨병성 심근병증의 2차 예방을 위하여 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 추후 그 기전에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

핵심되는 말 : 당뇨병성 심근병증, PPAR-α, -γ agonist, metformin

당뇨병 동물모델에서 PPAR-γ,-α Agonists 및 Metformin의 당뇨병성 심근병증에 대한 치료효과

<지도교수 차 봉 수>

연세대학교 대학원 의학과

이 광 은

Ⅰ. 서 론

당뇨병 환자의 주요 사망원인은 심혈관계 질환으로 관동맥질환과 당뇨병성 심근병증의 형태로 나타난다. 당뇨병성 심근병증이란 관동맥질환과 무관하게 당뇨병 환자에서 발생하는 심실기능의 장애로 초기에는 이완기의 장애를 보이며, 당뇨병이 진행하면서 수축기의 장애를 동반하여 결국 심부전의 증상을 나타내게 된다[1,2].

당뇨병성 심근병증의 초기 현상인 이완기 장애는 좌심실 이완기간이 길어지고, 심근의 탄력이 감소하는 것이 특징이다. 이러한 심실의 이완기 장애는 심근 간질의 콜라겐 축적 및 심근의 세포자살(apoptosis)과 관련이 있슴이 동물실험으로 증명된 바 있다[2].

이와 같은 당뇨병성 심근병증을 조기에 진단하면 심부전으로의 진행을 예방할 수 있을 것이다. 이러한 의미에서 조기진단은 매우 중요하며 심초음파 검사가 당뇨병성 심근병증의 초기 현상인 심실의 이완기 장애를 진단할 수 있는 비침습적이고 정확한 방법으로 이용되고 있다. 즉 이완기의 장애가 나타나면 Doppler 심초음파 검사상 E파와 E/A ratio는 감소하고, A파는 증가하며 E파의 감속시간은 증가하는 양상을 보이게 된다[1].

최근 개발되어 사용되고 있는 thiazolidinedione계 약물은 PPAR-γ agonist로서 인슐린 저항성을 개선시키는 인슐린 증감제로 알려져 있고 당뇨병 동물모델, 비만환자 그리고 제2형 당뇨병 환자에서 대사이상을 호전시키는 것으로 밝혀졌다. 또한 당뇨병 동물모델에서 당뇨병 발생 전단계에서 심실 이완기 장애를 호전시킬 수 있슴이 보고된 바 있다[2].

또다른 인슐린 증감제인 metformin은 주로 간장에 작용하며 동시에 말초장기에서 인슐린의 효과를 향상시키는 약물로 현재 사용중이다. Metformin 역시 중성지방을 감소시켜 당뇨병 환자의 대사이상을 호전시키는 것으로 알려져 있다[3,4].

현재까지 PPAR-α agonist인 fenofibrate가 당뇨병성 심근병증에서 심실기능을 향상시킨다는 보고는 없지만, 당뇨병성 심근병증이 혈중 유리지방산의 증가 및 심근에서 지방산 산화와 밀접한 관련이 있다는 최근의 연구들에 비추어 볼 때 당뇨병성 심근병증을 호전시킬 수도 있다고

사료된다[5-8].

제2형 당뇨병 동물모델인 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF) rat은 사람의 인슐린 비의존형 당뇨병과 매우 유사한 병리현상을 보이는데, 약 20주가 되어서야 고혈당이 발생하고, 만성적인 당뇨병의 진행양상을 보이며, 약간의 비만이 동반되고, 숫컷에게 유전되는 특징이 있다. 또한 당뇨병을 보이기 전 단계에는 인슐린 저항성을 동반한 정상혈당을 나타내며, 콜라겐 합성과 관련된 유전자의 발현이 증가되어 있는 특징을 보인다. 이와함께 OLETF rat의 대조군 모델로 정상혈당을 보이는 Long-Evans Tokushima Otsuka(LETO) rat이 개발되어 연구되어 지고 있다[2].

본 연구에서는 당뇨병 쥐모델에서 인슐린 증감제인 PPAR-γ agonist와 metformin 및 PPAR-α agonist로 치료했을 때 당뇨병성 심근병증의 진행에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 대상 및 방법

1. 실험동물 및 처치

실험에는 당뇨병 동물모델인 OLETF rats과 대조군인 LETO rats을 사용하였다. 21 - 22주에 경구 당부하검사를 통해 당뇨병이 확인된 쥐들을 다음과 같이 나누어 사육하였다.

1) 약물을 투여하지 않은 LETO rats(LETO) 2) 약물을 투여하지 않은 OLETF rats(O - C) 3) pioglitazone(PPAR - γ agonist)을 투여한 OLETF rats(O - P) 4) fenofibrate(PPAR - α agonist)를 투여한 OLETF rats(O - F) 5) metformin을 투여한 OLETF rats(O - M)로 나누어 10주간 약물을 투여하였다.

투여용량은 체중 kg당 1일 pioglitazone 10 mg, fenofibrate 150 mg, metformin 300 mg을 투여하였고, 이들 모든 쥐에서 치료전과 치료후에 심초음파 검사를 시행하였다.

실험동물은 연세대학교 의과대학 임상의학연구센터에서 12시간 간격의 light/dark cycle로 온도조절된 환경하에 사육하였고, 실험기간동안 standard rat chow에 자유롭게 접근하도록 하였다. 실험 계획서는 연세대학교 동물실험실 위원회의 승인을 받았다.

2. 심초음파 검사

치료전과 치료후에 쥐들을 마취시킨 후 가슴털을 제거하고 앙와위와 좌측위 상태에서 심초음파 검사를 시행하였다. 마취제는 ketamine HCl (50mg/kg IP)와 xylazine (10mg/kg IP)를 사용하였다. 12 MHz 변환기가 달려있는 초음파기를 이용하였으며, 승모판을 지나는 유동속도는 심첨부 조사상 승모판 말단부에서 측정하였고, 혈류의 유입양상은 strip chart에 기록하여 분석하였다.

심실 이완기능은 peak transmitral flow velocity in early diastole(E), peak transmitral flow velocity in late diastole(A), E/A ratio, deceleration time of E wave(DTe) 등의 지표를 측정하였고, 심실 수축기능은 M-mode를 이용하여 left ventricular end-diastolic dimension(LVEDD), left ventricular end-systolic dimension(LVESD), diastolic interventricular septum thickness(IVSd), systolic interventricular septum thickness(IVSs), fractional shortening(FS, [(LVEDD-LVESD)/LVESD] x 100%), 및 ejection fraction(EF) 등의 지표를 측정하였다. 심장 박동수는 심초음파상의 strip chart를 통하여 계산되었다.

3. 혈청생화학 검사

치료전과 치료후에 실험동물의 체중과 식이섭취량을 정기적으로 조사하였다. 38주에 실험전 8-10시간 금식후 경구 당부하검사(포도당 2g/kg)를 시행하였다. 포도당 투여전과 투여후 30, 60, 90, 120분에 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 혈당측정은 포도당 산화법을 이용하였다.

심초음파 검사후 밤사이 금식시킨 쥐를 희생시켜 대동맥에서 혈액을 채취하여 혈청 중성지방, 총콜레스테롤, 유리 지방산치를 효소분석법을 이용하여 측정하였다.

4. 통계분석

통계분석에는 SPSS win 10.0 program을 이용하였다. 군간의 차이를 비교할 때는 independent samples t-test와 one-way ANOVA test를 이용하였고, p value가 0.05 미만인 경우 통계적 의미가 있다고 평가하였다. 모든 값은 평균±표준오차로 표현하였다.

Ⅲ. 결　과

1. 체중 변화

일일 식이섭취량은 각 군간에 차이가 없었다. LETO와 O-C군간의 체중 차이는 없었다. 38주에 O-P군은 다른 군에 비하여 유의한 체중 증가를 보였다. 심장의 무게는 각 군간에 차이가 없었으나, 체중에 대한 심장무게의 비는 O-P군에서 다른 군에 비하여 감소되어 있었다(Table 1).

Table 1. Body weight, heart weight, plasma glucose and plasma lipid after treatment

	LETO	O - C	O - P	O - F	O - M
n	10	10	10	10	10
Body weight (g)	491±12	545±17	721±27[ab]	512±27	522±17
Food intake (g/d)	28.3±1.1	29.5±1.5	26.9±1.3	26.3±1.1	26.8±1.5
Heart weight (g)	1.26±0.03	1.29±0.04	1.43±0.07	1.44±0.08	1.45±0.05
H/B weight ratio (mg/g)	2.58±0.09[c]	2.37±0.07	1.99±0.10	2.81±0.10[c]	2.79±0.09[c]
Fasting glucose (mg/dL)	95.8±1.6	118.1±4.7[a]	114.0±3.2[a]	100.6±4.6[b]	98.8±2.3[b]
Total cholesterol (mg/dL)	77.3±3.4	83.4±4.9	86.7±3.5	109.6±3.2[b]	72.7±1.2
Triglycerides (mg/dL)	75.9±7.9	192.2±27.9[a]	100.1±5.7[b]	75.0±6.9[b]	65.0±16.5[b]
Free fatty acids (mEq/L)	844±70	995±29	808±43	904±65	982±68

Data are the means±SEM.

[a] $p<0.05$, compared to levels of LETO.

[b] $p<0.05$, compared to levels of O - C.

[c] $p<0.05$, compared to levels of O - P.

2. 각 군 간의 경구 당부하검사 및 혈청 생화학검사 비교

10주간의 치료후 38주에 시행한 경구 당부하검사상 O - C군은 LETO군에 비하여 공복혈당과 식후혈당이 증가되어 있었다. O - F군과 O - M군은 O - C군에 비하여 공복혈당이 감소되어 있었고, O - P군은 O - C군에

비하여 식후혈당이 감소되어 있었다(Figure 1).

혈청 생화학검사상 O-C군은 LETO군에 비하여 총콜레스테롤과 유리지방산치에서 차이가 없었으나 중성지방은 매우 증가되어 있었다. O-C군에 비하여 O-F군과 O-M군에서는 중성지방치가 감소되어 있었다. 총콜레스테롤은 O-F군에서 오히려 증가하였다(Table 1).

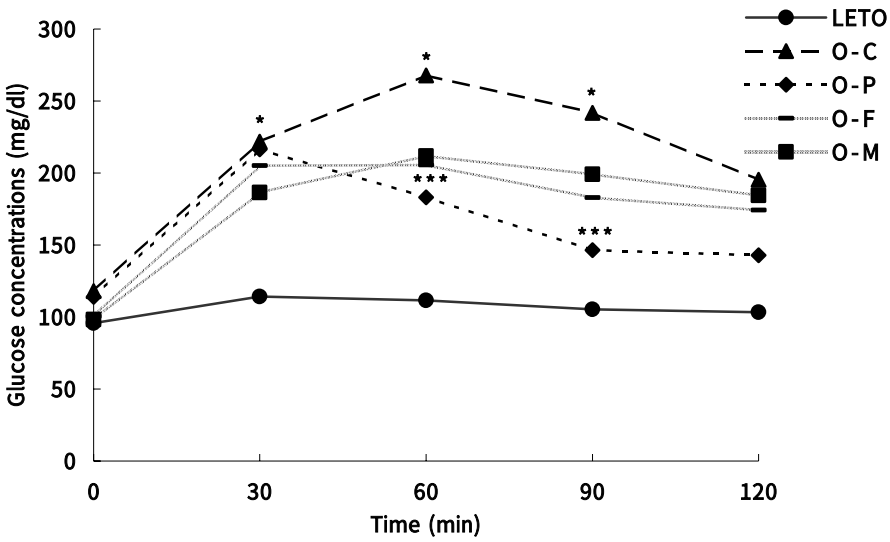

Figure 1. Blood glucose concentrations before and after oral glucose load at post-treatment (38 weeks)

* $p<0.05$, compared to levels of LETO, *** $p<0.05$, compared to levels of O-C.

3. LETO군과 OLETF군의 치료전 심초음파 비교

당뇨병이 발현된 이후인 28주에 시행한 심초음파 검사상 LETO군과 O-C군 간에 심실의 수축기능을 나타내는 지표인 LVESD, LVEDD, FS과 심실의 이완기능을 나타내는 지표인 E, A, E/A ratio, DTe 모두 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Doppler echocardiography at baseline in LETO and OLETF rats

	LETO	O-C	O-P	O-F	O-M	Sig.
n	10	10	10	10	10	
LVEDD(mm)	78.7±2.7	79.2±1.9	78.5±1.7	80.2±1.4	79.1±1.5	NS.
LVESD(mm)	42.1±1.4	37.0±1.7	37.2±1.6	39.3±1.5	38.8±1.6	NS.
FS(%)	46.2±2.6	53.5±1.3	51.2±1.1	52.8±1.1	52.2±1.2	NS.
E(cm/s)	74.7±7.2	88.0±5.2	84.3±5.4	83.9±6.1	84.4±6.3	NS.
A(cm/s)	59.2±5.3	62.5±3.7	61.7±3.4	61.2±4.3	60.5±3.9	NS.
E/A ratio	1.31±0.16	1.45±0.12	1.37±0.13	1.42±0.17	1.39±0.15	NS.
DTe(ms)	53.8±4.6	59.7±1.1	57.9±1.2	59.1±1.1	58.8±1.3	NS.

Data are the means±SEM.
LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVESD, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; E, peak transmitral flow velocity in early diastole; A, peak transmitral flow velocity in late diastole; DTe, deceleration time of E wave.

4. 각 군의 치료후 심초음파 비교

치료후 LETO군과 O-C군 간에 심실 수축기능에서는 차이가 없었으나 심실 이완기능을 나타내는 지표인 E와 E/A ratio가 유의한 감소를 보였다(Table 3).

O-C군과 각 치료군을 비교하였을 때 O-P군에서는 IVSs와 E가 증가하였고 DTe는 감소하였으며 O-F군에서는 E/A가 증가하였고 DTe는 유의한 감소를 보였다. 또한 O-M군에서도 IVSs가 증가하였고 DTe는 감소하였다(Table 3).

Table 3. Doppler echocardiography after treatment with vehicle, pioglitazone, fenofibrate, and metformin in LETO and OLETF rats

	LETO	O-C	O-P	O-F	O-M
N	10	10	10	10	10
LVEDD(mm)	87.5±8.6	83.9±8.2	89.2±9.2	82.9±5.2	84.8±8.6
LVESD(mm)	46.2±7.2	43.0±4.8	44.2±8.8	38.7±8.0	40.4±8.5
FS(%)	47.3±1.9	48.4±2.0	50.6±2.3	52.9±3.4	50.3±2.0
E(cm/s)	84.5±5.6	68.0±3.2[a]	82.0±4.3[b]	72.3±9.1	67.5±8.9
A(cm/s)	56.3±4.8	55.2±3.3	54.9±2.5	46.5±2.5	53.4±6.8
E/A ratio	1.54±0.08	1.25±0.06[a]	1.39±0.06	1.57±0.05[b]	1.26±0.03
DTe(ms)	56.3±3.8	74.3±3.7[a]	51.6±1.7[b]	61.1±4.3[b]	57.3±4.7[b]

Data are the mean±SEM.

LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVESD, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; E, peak transmitral flow velocity in early diastole; A, peak transmitral flow velocity in late diastole; DTe, deceleration time of E wave.

[a] $P<0.05$, compared to levels of LETO.

[b] $P<0.05$, compared to levels of O-C.

Ⅳ. 고 찰

심혈관계 질환은 당뇨병 환자의 주요 사망원인으로 당뇨병과 관련된 주된 심혈관계 질환은 죽상경화증에 의한 관동맥질환이다. 그러나 당뇨병 환자는 관동맥질환과는 무관하게 비당뇨인에 비하여 심혈관계 질환의 유병율과 사망률, 특히 심부전의 위험이 매우 증가한다[9-12]. 이러한 심부전 이환율의 증가는 당뇨병성 심근병증이라고 알려진 심실의 기능장애가 중요하게 작용한다[13].

당뇨병 환자에서는 심실의 수축기능과 심부전 증상이 일치하지 않는 경우가 많은데, 급성 심근경색 이후에 비슷한 수축기능을 가진 비당뇨인에 비하여 더욱 심한 심부전 증상을 호소하며, 예후도 매우 좋지 않은 것을 알 수 있다[14]. 이러한 현상의 원인으로 당뇨병 환자들에서 나타나는 심실의 이완기 장애가 작용할 수 있다. 이러한 이완기 장애는 수축기 장애에 선행하여 나타난다[15].

고혈압 환자의 경우 이완기 장애는 나쁜 예후인자의 하나로 알려져 있다[16]. 그러나 당뇨병 환자들에서 나타나는 이완기 장애가 환자의 예후와 관련하여 어떠한 의미가 있는지는 완전히 정립되어 있지 않다. 하지만 당뇨병 환자에서 당뇨병성 심근병증의 임상적인 증상이 나타나기 전에 이완기 장애를 조기에 발견하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다[13]. 또한 당뇨병 환자에서 급증하는 심혈관계 질환과 그에 의한 사망률을 줄이고,

심부전으로의 진행을 예방하기 위하여 이완기의 장애가 발견되었을 경우 조기에 적극적인 치료를 하는 것이 중요할 것으로 생각된다.

Doppler 심초음파 검사는 이완기 장애를 진단하는 정확하고 비침습적인 방법으로 알려져 있다[17]. 일반적인 당뇨병성 심근병증은 미세혈관의 허혈성 변화가 없이 조기에 이완기능(확장기말 심실내압의 증가와 이완기간의 증가)의 저하를 나타내며, 이어서 수축기능(수축기말 심실 부피의 증가, 심실 구출율의 저하)의 저하를 보인다[18].

당뇨병성 심근병증의 병태생리와 의미에 관하여는 아직까지 논란이 많지만, 당뇨병에서 나타나는 심실기능의 장애와 관련하여 관찰되는 현상으로 심근의 에너지 대사장애, 즉 포도당 및 지방산 대사의 장애가 거론되고 있다[19-26].

정상적으로 심근에서 이용하는 에너지원은 지방산(60-70%)과 포도당으로 알려져 있다. 그러나 당뇨병이 발생되면 심근은 에너지원으로 지방산을 95% 이상 이용하게 된다. 즉, 당뇨병 상태가 되면 포도당 대사에 장애가 발생하게 된다. 먼저 GLUT-4 단백질과 mRNA의 감소로 인하여 포도당의 유입이 감소된다. 당뇨병성 심근에서 당분해 속도가 감소하는 것은 glucose-6-phosphate 및 fructose-6-phosphate와 다른 당분해 대사산물의 새포내 축적과 관련되어 있다. 또한 당뇨병은 포도당 산화율이 감소하는데, 이것은 심근 세포내의 pyruvate dehydrogenase(PDH) 활성의 감소 때문으로 설명되고 있다. 혈중의

증가된 유리 지방산과 심근에서 증가된 지방산 산화가 PDH 활성의 감소와 이에 따른 포도당 산화의 감소에 매우 중요한 요인으로 생각되어지고 있다[27,28]. 결국 당뇨병 환자의 심근에서는 당유입, 당분해, 당산화가 모두 감소되며, 심실은 수축력의 감소를 보이게 된다.

포도당 대사의 변화뿐 아니라 심근의 지방산 산화도 변화를 보인다. 그러나 변화된 지방산 대사가 어떻게 당뇨병성 심근병증의 발생에 관여하는 지는 아직 논란이 많은 실정이다. 지방산 산화를 담당하는 가장 중요한 부위는 carnitine pamitoyl transferase(CPT)-1이며 이는 malonyl CoA에 의하여 조절을 받는다. 당뇨병 환자의 심근에서 CPT-1에 대한 malonyl CoA의 억제 정도는 정상인과 비교해서 변화가 없어[29,30], malonyl CoA의 농도가 지방산 산화를 조절하는 가장 중요한 요소라고 할 수 있다. Sakamoto 등에 의하면 당뇨병 동물모델에서는 심근내 malonyl CoA decarboxylase(MCD)의 뚜렷한 증가가 있으나 acetyl CoA carboxylase(ACC)의 활성은 대조군과 차이가 없다고 한다[31]. 이러한 결과로 MCD 활성의 증가가 당뇨병 환자의 심근에서 증가된 지방산 산화와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다.

그러나 이러한 변화들을 당뇨병에 의해 변화된 환경에 적응한 결과로 생각해 볼 수도 있을 것이다[24,25]. 당뇨병성 심근은 지방산 대사와 관련된 단백질의 발현증가와 그에 따른 지방산 대사의 증가를 통해서 심실기능을 유지할 수 있는 능력이 있다. 그러나 만성적으로 고혈당, 고지혈증에

노출될 경우 아직 규명되지 않은 기전들에 의하여 심근내 PPAR-α 발현의 급격한 감소를 관찰할 수 있고, 이는 심근이 지방산 산화를 조절할 수 있는 능력을 제한하여 지방독성(lipotoxicity)을 일으키며 결국 심실 수축기능의 장애를 초래한다고 할 수 있다[32-35].

본 실험에서 PPAR-γ agonist로 치료한 OLETF rats에서는 경구 당부하검사상 30분과 60분에 유의한 혈당의 감소를 보였고, PPAR-α agonist로 치료한 군에서는 경구 당부하검사상 공복혈당의 저하를 보였다. 중성지방의 농도는 두 군 모두 유의하게 저하시킴을 알 수 있었다. 당뇨병이 진행된 OLETF rats에서 수축기능의 장애는 없었지만, 심실 이완기능의 감소를 증명할 수 있었고, 이러한 변화들이 PPAR-α,-γ agonists의 투여를 통하여 예방될 수 있음을 관찰할 수 있었다.

PPARs ligands가 어떻게 당뇨병성 심근병증을 예방할 수 있는지는 아직까지 명확히 설명하기 어렵다. 고혈당과 고지혈증의 개선에 의한 것인지, 아니면 심장의 당대사와 지질대사에 직접적으로 작용하여 나타난 변화인지 역시 아직 대답하기 어려운 문제이다. Aasum 등이 *db/db* mice를 PPAR-α agonist로 장기간 치료했을 때 지방산 산화율을 감소시키고 포도당 산화율을 증가시켰다는 보고는 있으나[36], 이것이 심실의 수축력을 증가시키지는 못했다. PPAR-α agonist가 어떻게 당뇨병성 심근에 작용되는 지는 알 수 없지만 아마도 유리 지방산 유입이나 산화와 관련된 유전자에 직접 작용하거나 key enzyme의

활성도를 조절하는 고지혈증 강하효과를 통하여 간접적으로 작용할 가능성이 있다.

Tsuji 등은 당뇨병 발병 전단계의 당뇨병 동물모델을 이용하여 5주간 PPAR-γ agonist로 치료할 경우 심실 이완기능이 향상됨을 관찰한 바 있다[37]. 이와는 반대로 본 실험에서는 이미 당뇨병이 진행된 이후에도 장기간 PPAR-γ agonist를 투여할 경우 이완기능의 장애를 예방할 수 있었고, 이러한 효과는 PPAR-α agonist와 metformin에서도 발견되었다.

Verma 등은 metformin을 이용하여 streptozotocin-induced diabetic rats에서 심실기능을 향상시킬 수 있었으며, 이는 metformin에 의한 혈당의 개선과 중성지방의 감소에 의한 결과일 것으로 생각하였다[3,4]. Dutta 등도 sucrose-fed rats에서 metformin을 투약할 경우 인슐린 저항성의 개선과 심실기능의 이상이 호전됨을 보고한 바 있다[23]. 본 실험에서도 metformin 치료군에서 심실기능의 향상을 살펴볼 수 있었고, 이는 또한 혈당의 개선과 중성지방의 감소를 동반하여 이러한 심실 기능의 호전이 대사이상의 교정을 통했을 가능성이 크다고 생각할 수 있으나 역시 그 정확한 기전은 알 수 없다.

PPARs ligands와 metformin이 어떻게 심실 이완기능의 저하를 예방하는 지에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결국 이러한 모든 대사이상, 즉 포도당 대사와 지질 대사의 불균형을 통하여 심근에서 나타나는 궁극적인 변화는 심근내 간질의 섬유화가

진행한다는 것이다. Katsufumi 등은 당뇨병 동물모델과 대조군을 이용한 실험에서 심실 이완기능의 저하와 더불어 콜라겐 용량의 증가를 관찰할 수 있었다[38-40]. 최근에는 심근의 지방축적을 특수염색을 통하여 살펴봄으로써 대사이상의 결과를 직접 확인하는 연구 결과들을 많이 살펴볼 수 있다[7]. 본 실험에서 콜라겐 용량의 측정을 하지 못한 것이 아쉽고 향후 이러한 연구가 시행되어 진다면 콜라겐이나 지방축적에 관한 실험도 반드시 시행되어야 될 것으로 생각한다.

본 실험을 통하여 제2형 당뇨병의 동물모델인 OLETF rats에서 정상 대조군인 LETO rats에 비해 심실 이완기능이 저하되어 있슴을 확인하였으며, 이러한 장애는 인슐린 증감제로 알려진 PPAR-γ agonist와 metformin 및 PPAR-α agonist에 의하여 호전됨을 알 수 있었다. 이러한 결과가 심초음파를 통한 당뇨병성 심근병증의 조기 진단을 통해 치료에 이용된다면 당뇨병 환자의 심근병증에 의한 심부전증을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

당뇨병의 동물모델인 OLETF rat과 대조군인 LETO rat을 이용하여 당뇨병성 심근병증에 관하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 당뇨병이 진행된 38주에 OLETF rats에서 대조군과 비교하여 심실 이완기능이 유의하게 감소 되었다.
2. 인슐린 증감제인 PPAR-γ agonist와 metformin은 이러한 심실 이완기능의 저하를 예방할 수 있었다.
3. PPAR-α agonist도 당뇨병성 심근병증을 예방하는 효과가 있었다.

이상의 결과로 생각해 보았을 때 당뇨병에 의한 지질대사의 이상이 당뇨병성 심근병증의 발생에 매우 중요할 것으로 보이며, 특히 PPARs에 의한 지질대사 조절경로와 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한 당뇨병성 심근병증은 사람에서도 약물 투여에 의하여 예방되어 질 수 있을 것으로 생각되며, 이는 당뇨병성 심근병증으로 인한 심부전증을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Annonu AK, Fattah AA, Mokhtar MS, Ghareeb S, Elhendy A. Left ventricular systolic and diastolic functional abnormalies in asymptomatic patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Am Soc Echocardiogr 2001;14:885-91.
2. Yao L, Mizushige K, Noma T, Murakami K, Ohmori K, Matsuo H. Improvement of left ventricular dynamics in prediabetic stage of a type II diabetic rat model after troglitazone treatment. Angiology 2001;52:53-7.
3. Verma S, McNeill JH. Metformin improves cardiac function in isolated streptozotocin-diabetic rat hearts. Am J Phsiol 1994;266:714-9.
4. Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Decreased vascular reactivity in metformin-treated fructose-hypertensive rats. Metabolism 1996;45:1053-5.
5. Gibbons GF, Patel D, Wiggins D, Knight BL. The functional efficiency of lipogenic and cholesterogenic gene expression in normal mice and in mice lacking the PPAR-α. Advan Enzyme Regul 2002;42:227-47.

6. Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, et al. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of PPAR-α knock-out mice. J Biol Chem 2002;277:26089-97.
7. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, et al. The cardiac phenotype induced by PPAR-α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. J Clin Invest 2002;109:121-30.
8. Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JRB, Belke DD, et al. A role of PPAR-α in the control of cardiac malonyl–CoA levels. J Biol Chem 2002;277:4098-103.
9. Zarich SW, Nesto RW. Diabetic cardiomyopathy. Am Heart J 1989;118:1000-12.
10. Davidoff AJ, Ren J. Low insulin and high glucose induce abnormal relaxation in cultured adult rat ventricular myocytes. Am J Phsiol 1997;272:159-67.
11. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium. Diabetes 2002;51:1938-48.
12. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard

BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease. Circulation 1999;100:1134 - 46.

13. Raev DC. Which left ventricular function is impaired early in the evoluation of diabetic cardiomyopathy? A echocardiographic study of young type I diabetic patients. Diabetes care 1994;17:633 - 9.

14. Moller JE, Sondergaard E, Poulsen SH, Egstrup K. Pseudonormal and restrictive filling patterns predict left ventricular dilation and cardiac death after a first myocardial infarction: a serial color M - mode Doppler echocardiographic study. J Am Coll Cardiol 2000;36:1841 - 6.

15. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, et al. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. J Am Coll Cardiol 1989;14:49 - 57.

16. Schillaci G, Pasqualini L, Verdecchia P, Vaudo G, Marchesi S, Porcellati C, et al. Prognostic significance of left ventricular diastolic dysfunction in essential hypertension. J Am Coll Cardiol 2002;39:2005 - 11.

17. Appleton CP, Jensen JL, Hatle LK, Oh JK. Doppler evaluation of

left and right ventricular diastolic function: a technical guide for obtaining optimal flow velocity recording. J Am Soc Echocardiogr 1997;10:271 - 92.

18. Paillole C, Dahan M, Paycha F, Solal AC, Passa P, Gourgon R. Prevalence and significance of left ventricular filling abnormalities determined by Doppler echocardiography in young type I diabetic patients. Am J Cardiol 1989;64:1010 - 617.

19. McGarry JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. Diabetes 2002;51:7 - 18.

20. Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. Am J Physiol 1996;271:1319 - 26.

21. Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schunekess BO. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. Biochim Biophys Acta 1994;1213:263 - 76.

22. Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. Cardiovasc Res 1997;34:25 - 33.

23. Dutta K, Podolin DA, Davidson MB, Davidoff AJ. Cardiomyocyte dysfunction in sucrose - fed rats is associated with insulin resistance.

Diabetes 2001;50:1186 - 92.

24. Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I. Circulation 2002;105:1727 - 33.

25. Young ME, McNulty P, Taegtmeyer H. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II. Circulation 2002;105:1861 - 70.

26. Dyntar D, Eppenberger - Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinas GA, et al. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. Diabetes 2001;50:2105 - 13.

27. Wall SR, Lopaschuk GD. Glucose oxidation rates in fatty acid - perfused isolated working hearts from diabetic rats. Biochim Biophys Acta 1989;1006:97 - 103.

28. Chatham JC, Forder JR. Relationship between cardiac function and substrate oxidation in hearts of diabetic rats. Am J Physiol 1997;273:52 - 8.

29. Cook GA, Gamble MS. Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent Ki values for malonyl - CoA. J Biol Chem 1987;262:2050 - 55.

30. Hamilton C, Saggerson ED. Malonyl–CoA metabolism in cardiac myocytes. Biochem J 2000;295:61 - 6.

31. Sakamoto J, Barr RL, Kavanagh KM, Lopaschuk GD. Contribution of malonyl - CoA decarboxylase to the high fatty acid oxidation rates seen in the diabetic hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;278:1196 - 204.

32. Zhou Y, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. Proc Natl Acad Sci 2000;97:1784 - 9.

33. Unger RH. Lipotoxic disease. Annu Rev Med 2002;53:319 - 36.

34. Patane G, Anello M, Piro S, Vigneri R, Purrello F, Rabuazzo AM. Role of ATP production and uncoupling protein - 2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of PPAR - γ inhibition. Diabetes 2002;51:2749 - 56.

35. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med 2002;53:409 - 35.

36. Aasum E, Belke DD, Severson DL, Riemersma RA, Cooper M, Andreassen M, Larsen TS. Cardiac function and metabolism in type 2 diabetic mice after treatment with BM 17.0744, novel PPAR -

alpha activator. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;283:949 - 57.

37. Tsuji T, Mizushige K, Noma T, Murakami K, Ohmori K, Miyatake A, et al. Pioglitazone improves left ventricular diastolic function and decreases collagen accumulation in prediabetic stage of a type II diabetic rat. J Cardiovasc Pharmacol 2001;38:868 - 874.

38. Lagadic - Gossmann D, Buckler KJ, Prigent KL, Feuvray D. Altered $Ca2^{+}$ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. Am J Phsiol 1996;270:1529 - 37.

39. Mizushige K, Yao L, Noma T, Kiyomoto H, Yu Y, Nosomi N, et al. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin - resistant prediabetic stage of type II diabetic rat model. Circulation 2000;101:899 - 907.

40. Takano H, Nagai T, Asakawa M, Toyozaki T, Oka T, Komuro I, et al. PPAR activators inhibit lipopolysaccharide - induced tumor necrosis factor - α expression in neonatal rat cardiac myocyte. Circ Res 2000;87:596 - 602.

Abstract

The effects of PPAR-γ and -α agonists and metformin on diabetic cardiomyopathy in diabetic animal model

Kwang Eun Lee

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Assistant Professor Bong Soo Cha)

Diabetic cardiomyopathy is a functional defect independent of coronary vascular disease. In contrast to type 1 diabetes, relative little is known about the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy in type 2 diabetes. The present study was designed to determine whether established insulin sensitizers could reverse diabetic cardiomyopathy.

Recently developed male Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat shows polygenic traits, mild obese, hyperlipidemic,

insulin resistant, and chronic diabetic animal model, which represents human type 2 diabetes. These rats usually became diabetic at the age of 20 weeks. From the age of 28 weeks, OLETF rats were treated with vehicle (O-C), pioglitazone (O-P, 10 mg/kg/d), fenofibrate (O-F, 150 mg/kg/d), and metformin (O-M, 300 mg/kg/d) for 10 weeks respectively (n=10). Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO, n=10) rats were used as non-diabetic control animals. Doppler echocardiographic evaluation was performed at the 28 and 38 weeks of age in all groups.

All OLETF rats showed diabetic glucose tolerance at the age of 22 weeks confirmed by oral glucose tolerance test. At the age of 38 weeks, OLETF rats showed prolonged deceleration time (DTE) (74.3±3.7 vs. LETO, 56.3±3.8 ms, $p<0.001$) and decreased E/A ratio (1.25±0.06 vs. LETO, 1.54±0.08, $p<0.01$). OLETF rats treated with pioglitazone, fenofibrate and metformin improved both DTE (O-P, 51.6±1.7, O-F, 61.1±4.3, O-M, 57.3±4.7 ms, $p<0.001$, respectively) and E/A ratio (O-P, 1.39±0.06, O-F, 1.57±0.05, $p<0.05$, O-M, 1.26±0.03, NS) compared with O-C. Parameters related systolic function did not changed among all groups.

PPAR-γ and -α agonists and metformin could recover diabetic

cardiomyopathy in OLETF rats. These drugs can be used for secondary prevention of diabetic cardiomyopathy possibly through improvement of lipid metabolism.

Key Words : Diabetic cardiomyopathy, PPAR-α, -γ agonist, metformin